

(38)

## PRODUCTION OF MALONIC ACID DERIVATIVE

Patent number: JP10229891  
Publication date: 1998-09-02  
Inventor: OZAKI EIJI; ENOMOTO KANEHIKO  
Applicant: MITSUBISHI RAYON CO LTD  
Classification:  
- International: C12P7/62  
- european:  
Application number: JP19970036510 19970220  
Priority number(s):

Report a data error here

## Abstract of JP10229891

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a producing method excellent in productivity of a malonic acid monoester useful as a synthetic intermediate for various chemicals, pharmaceutical agents, agrochemicals, etc.

**SOLUTION:** A cyanoacetic acid ester represented by the formula  $\text{NCCH}_2\text{COOR}$  (R is an alkenyl group, an aryl group, an aralkyl group or a 3-20C alkyl group) is treated with the cultured product, a cell or a cell treated material of a microorganism having nitrilase activity to produce the objective malonic acid monoester represented by the formula  $\text{HOOCCH}_2\text{COOR}$  (R is mentioned above).

---

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-229891

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月2日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

識別記号

F I

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

// (C 1 2 P 7/62

C 1 2 R 1:01)

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-36510

(22) 出願日 平成9年(1997) 2月20日

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都港区港南一丁目6番41号

(72) 発明者 尾崎 英司

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ  
ン株式会社中央技術研究所内

(72) 発明者 榎本 兼彦

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ  
ン株式会社中央技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 マロン酸誘導体の製造法

(57) 【要約】

【課題】 種々の化成品、医薬、農薬等の合成中間体として有用なマロン酸モノエステルの生産性に優れた製造方法を提供する。

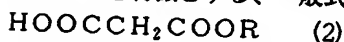
【解決手段】 一般式(1) :  $\text{NCCH}_2\text{COOR}$  (式中、Rは、アルケニル基、アリール基、アラルキル基、又は炭素数3~20のアルキル基を示す。) で表されるシアノ酢酸エステルを、ニトリラーゼ活性を有する微生物の培養物、菌体又は菌体処理物で処理して加水分解することを特徴とする、一般式(2) :  $\text{HOOCCH}_2\text{COOR}$  (式中、Rは、前記のとおりである。) で表されるマロン酸モノエステルの製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)：



(式中、Rは、アルケニル基、アリール基、アラルキル基、又は炭素数3～20のアルキル基を示す。)で表されるシアノ酢酸エステルを、ニトリラーゼ活性を有する微生物の培養物、菌体又は菌体処理物で処理して加水分解することを特徴とする、一般式(2)：



(式中、Rは、前記のとおりである。)で表されるマロン酸モノエステルの製造方法。

【請求項2】 ニトリラーゼ活性を有する微生物が、ロドコッカス(Rhodococcus)属に属する微生物である、請求項1に記載のマロン酸モノエステルの製造方法。

【請求項3】 加水分解反応中、反応液のシアノ酢酸エステルの濃度を0.01～10重量%の範囲に維持しながら該エステルを連続添加することとを特徴とする、請求項1又は2に記載のマロン酸モノエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、種々の化成品、医薬、農薬等の合成中間体として有用なマロン酸モノエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】マロン酸モノエステルの製造方法としてはマロン酸ジエステルを化学的に加水分解する方法が一般的である。しかしながらこの方法では、反応終了後、生成物であるマロン酸モノエステルを、未反応のマロン酸ジエステルおよび副生成物であるマロン酸から単離するのが困難であり、高純度のマロン酸モノエステルを得ることができない。

【0003】高純度のマロン酸モノエステルを得る方法として、Meldrum's 酸を原料とする方法が知られている(例えば、Matoba Katsuhide et al., Chem. Pharm. Bull., 31(8), 2955(1983)、又はRigo B. et al., Tetrahedron Lett., 30(23), 3073(1989) 参照)。しかしながら、この方法は、高価なMeldrum's 酸を使用するため実用的な方法とは言い難く、工業的生産には適していない。

【0004】また、高純度のマロン酸モノエステルを得る方法として、マロン酸ジエステルにエステル結合を加水分解する能力を有する酵素又は微生物を作用させる方法が公知である(特開平8-173174号公報)。しかしながら、原料となるマロン酸ジエステルはコスト的に不利である。したがって、生産性に優れた高純度のマロン酸モノエステルの製造方法の開発が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、種々の化成品、医薬、農薬等の合成中間体として有用なマロン酸モノエステルの生産性に優れた製造方法を提供する

ことにある。

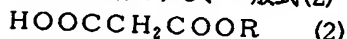
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、シアノ酢酸エステルに、ニトリラーゼ活性を有する微生物の培養物、菌体又は菌体処理物を作用させると、マロン酸モノエステルが選択的に生成され、エステル結合の加水分解等の副反応もなく、高純度のマロン酸モノエステルを製造することができることを見出し、本発明を完成した。

【0007】本発明は、一般式(1)：



(式中、Rはアルケニル基、アリール基、アラルキル基又は炭素数3～20のアルキル基を示す。)で表されるシアノ酢酸エステルを、ニトリラーゼ活性を有する微生物の培養物、菌体又は菌体処理物で処理して加水分解することとを特徴とする、一般式(2)：



(式中、Rは前記のとおりである。)で表されるマロン酸モノエステルの製造方法を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。上記一般式(1)又は(2)において、Rで表されるアルキル基は、直鎖又は分岐状のいずれの構造でもよい。このアルキル基の炭素数は3～20であり、好ましくは3～10であり、より好ましくは3～6である。具体的には、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、オクチル、2-エチルヘキシル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシルなどが例示される。

【0009】Rで表されるアルケニル基は、直鎖又は分岐状のいずれの構造でもよく、好ましくは炭素数2～6である。具体的には、ビニル基、アリル基などが例示される。Rで表されるアリール基としては、フェニル基などが例示される。

【0010】Rで表されるアラルキル基としては、ベンジル基などが例示される。一般式(1)で表されるシアノ酢酸エステルの中で、代表的な化合物としては、例えば、シアノ酢酸n-プロピル、シアノ酢酸イソプロピル、シアノ酢酸n-ブチル、シアノ酢酸tert-ブチル、シアノ酢酸2-エチルヘキシル、シアノ酢酸アリル、シアノ酢酸ベンジル等が挙げられる。

【0011】本発明に使用される微生物は、ニトリラーゼ活性を有していれば、特に制限されないが、例えば、ロドコッカス(Rhodococcus)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、ノカルディア(Nocardia)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、バチルス(Bacillus)属、エシェリキア(Escherichia)属、マイクロコッカス(Micrococcus)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、アエロモナス(Aeromonas)属、マイコプラズマ(Mycoplasma)属、セルロモナス(C

ellulomonas)属、エルビニア(Erwinia)属、キャンディダ(Candida)属等に属する微生物であって、ニトリラーゼ活性を有する微生物が挙げられる。

【0012】より具体的には、ロドコッカス ロドクロウス(Rhodococcus rhodochrous) ATCC 33025、シュードモナス シンキサンタ(Pseudomonas synxanta) IAM 12356、ブレビバクテリウム アセチリカム(Brevibacterium acetylicum) IAM 1790、ノカルディア アステロイデス(Nocardia asteroides) IFO 3384、アースロバクター オキシダンス(Arthrobacter oxydans) IFO 12138、バチルス サブチリス(Bacillus subtilis) ATCC 21697、エシェリキア コリ(Escherichia coli) IFO 3301、ミクロコッカス ルテウス(Micrococcus luteus) ATCC 383、ストレプトマイセス グリセウス(Streptomyces griseus) IFO 3355、アエロモナス パンクタタ(Aeromonas punctata) IFO 13288、マイコプラズマ ジモルファ(Mycoplasma mycoides) ATCC 4297、セルロモナス フィミ(Cellulomonas fimi) IAM 12107、エルビニア ヘルビコラ(Erwinia herbicola) IFO 12686、キャンディダ グリヤーモンディー(Candida guilliermondii) IFO 0566などが例示される。これらの微生物は、それぞれアメリカン タイプカルチャー コレクション(ATCC)、東京大学応用微生物研究所(IAM)、財団法人発酵研究所(IFO)などから入手可能である。

【0013】微生物の培養は、液体培地でも固体培地でも行うことができる。培地としては、微生物が通常資化する炭素源、窒素源、ビタミン、ミネラルなどの成分を適宜配合したものが用いられる。微生物の加水分解能を向上させるため、培地にニトリル化合物を少量添加することも可能である。培養は、微生物が生育可能である温度、pHで行われるが、使用する菌株の最適培養条件で行うのが好ましい。微生物の生育を促進させるため、通気攪拌を行ってもよい。

【0014】本発明においては、上記のようなニトリラーゼ活性を有する微生物を培地中で培養して得られる培養物をそのままか、又は該培養物から遠心分離などの集菌操作によって得られる菌体、若しくは菌体処理物を用いることができる。菌体処理物としては、アセトン、トルエン等で処理した菌体、菌体の破砕物、菌体を破砕した無細胞抽出物、菌体から分離した粗酵素又は精製酵素などが挙げられる。菌体又は菌体処理物は、架橋したアクリルアミドゲルなどに包括固定したり、イオン交換樹脂、ケーソー土などの固体担体に物理的、化学的に固定して用いることにより、反応を行った後に回収再利用することも可能である。

【0015】本発明において、マロン酸モノエステルは以下の方法で製造することができる。反応媒体に基質であるシアノ酢酸エステルを添加して溶解もしくは懸濁する。また、基質を反応媒体に添加する前に又は添加した後に触媒となる微生物の培養物等を加える。そして、反

応温度、必要により反応液のpHを制御しながら加水分解反応を行う。反応媒体としては、例えば、イオン交換水、緩衝液等が用いられる。反応温度は通常0~70℃、好ましくは10~35℃であるが、菌体等のニトリラーゼ活性が高くなる温度で行えばよい。反応液のpHは用いる微生物酵素の最適pHに依存するが、一般的にはpH6~9の範囲内で実施すると化学的加水分解反応による副反応を抑えることができるので好ましい。反応液中の菌体又は菌体処理物の濃度は、乾燥重量として通常0.01~5重量%相当量である。また、反応液の基質濃度は0.01~70重量%の間で特に制限はないが、0.1から15重量%の範囲内で行うことが好ましい。

【0016】さらに、加水分解反応中、シアノ酢酸エステルを連続添加することによりマロン酸モノエステルを高濃度に蓄積させることができる。その際、基質による酵素の失活を最小限に抑えるため、反応液の基質濃度を0.01~10重量%、好ましくは0.1~5重量%の範囲に維持しながら基質を添加する。

【0017】反応終了後、触媒として使用した微生物の菌体を遠心分離、濾過などの操作により除去してから、ヘキサン、酢酸エチルなどの溶剤で抽出することにより未反応のシアノ酢酸エステルを回収可能である。抽出残液を硫酸、塩酸などの酸でpH1~2とした後に、ヘキサン、酢酸エチルなどの溶剤で抽出することにより、生成物であるマロン酸モノエステルを得ることができる。

【0018】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】ロドコッカス ロドクロウス ATCC 33025を滅菌したLB培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5% NaCl) 3mlに植菌し、30℃で24時間振盪培養した。得られた菌体培養液1mlを滅菌した下記培地A 100mlに植菌し、30℃で48時間培養した。

【0019】

培地A (pH 7.2)

グリセロール	1.0 %
イソバレロニトリル	0.2 %
酵母エキス	0.02 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 %
NaCl	0.1 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02 %
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 ppm
CoCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 ppm
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 ppm
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	7 ppm

【0020】培養終了後、培養液を遠心分離し、得られた菌体の全量をイオン交換水で洗浄したのち、50mMリン酸緩衝液(pH7.0) 100mlに懸濁した。この菌体懸濁液の濁度は、OD<sub>630</sub> = 5.6 であった。この菌体懸濁液に基

質としてシアノ酢酸n-プロピル1.00gを添加し、30℃で1時間反応させた。反応液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC、カラム：TSKgel ODS-120A（東ソー株式会社製）、4.6mm I.D. × 25 cm、移動相：5%アセトニトリル、95%水、0.1%リン酸、流速：0.5ml/min、検出：UV 220nm）で分析したところ、全ての基質がマロン酸モノn-プロピルに変換されていた。反応終了後、遠心分離により菌体を除き、2N塩酸を添加し、pHを2.0に調整し、反応生成物であるマロン酸モノエチルを酢酸エチルで抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、溶媒を蒸発留去して、1.06gのマロン酸モノn-プロピルを得た（収率89.9%）。

【0021】〔実施例2〕基質としてシアノ酢酸イソプロピルを用いた以外は全て実施例1と同様にして1.01gのマロン酸モノイソプロピルを得た（収率88.6%）。

【0022】〔実施例3〕基質としてシアノ酢酸n-ブチルを用いた以外は全て実施例1と同様にして1.05gのマロン酸モノn-ブチルを得た（収率93.3%）。なお、HPLC分析の移動相として、40%アセトニトリル、60%水、0.1%リン酸を用いた。

【0023】〔実施例4〕基質としてシアノ酢酸t-ブチルを用いた以外は全て実施例3と同様にして1.04gのマロン酸モノt-ブチルを得た（収率92.4%）。

【0024】〔実施例5〕基質としてシアノ酢酸アリルを用いた以外は全て実施例3と同様にして1.04gのマロン酸モノアリルを得た（収率87.1%）。

【0025】〔実施例6〕基質としてシアノ酢酸2-エチルヘキシルを用いた以外は全て実施例3と同様にして1.00gのマロン酸モノ2-ヘチルヘキシルを得た（収率91.7%）。

【0026】〔実施例7〕基質としてシアノ酢酸ベンジルを用いた以外は全て実施例3と同様にして反応を行った。酵素反応終了後、10%のシアノ酢酸ベンジルが未反

応であった。未反応のシアノ酢酸ベンジルを酢酸エチルで抽出除去した。その抽出後、水層に2N塩酸を添加してpHを2.0に調整し、次いで反応生成物であるマロン酸モノベンジルを酢酸エチルで抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、溶媒を蒸発留去し、0.88gのマロン酸モノベンジルを得た（収率80.2%）。

【0027】〔実施例8～16〕実施例1と同様にして得られた菌体懸濁液に、シアノ酢酸n-プロピルを5～50重量%濃度となるように添加し、25℃で20時間反応させた。反応終了後の反応収率を液体クロマトグラフィーで測定した。結果を表1に示す。

【0028】

【表1】

実施例	基質濃度（重量%）	反応収率（%）
8	5	100
9	10	100
10	15	85.1
11	20	57.6
12	25	44.3
13	30	32.3
14	35	26.7
15	40	20.3
16	50	15.8

【0029】〔実施例20〕実施例1と同様にして得られた菌体懸濁液 100mlに、シアノ酢酸n-プロピルを5g添加し、25℃で反応させた。以後、反応液中の基質濃度が5重量%を超えないように、基質濃度を測定しながら合計30gのシアノ酢酸エチルを分割して添加した。30時間後、反応収率は100%であった。

【0030】

【発明の効果】本発明により、種々の化成品、医薬、農薬等の合成中間体として有用な、マロン酸モノエステルを生産性よく製造することができる。